

Beitrag zur Papierchromatographie der
Tinctura Arnicae Ph. Helv. V
und zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von
Arnica montana L.

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

ALPHONSE SANER

aus BÜSSERACH (Kt. Solothurn)

1965

CITY-DRUCK AG, ZÜRICH

1966

Beitrag zur Papierchromatographie der
Tinctura Arnicae Ph. Helv. V
und zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von
Arnica montana L.

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ALPHONSE SANER

aus BÜSSERACH (Kt. Solothurn)

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag
der Herren Professoren Dr. K. Leupin und Dr. K. Meyer.

Basel, den 29. Juni 1965

Prof. Dr. H. Annaheim
Dekan

Herrn Alphonse Saner wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 29. 6. 65 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 29. 6. 65 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen.

Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel: «Beitrag zur Papierchromatographie der Tinctura Arnicae Ph. Helv. V und zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Arnica montana* L.» kann eingesehen oder entliehen werden.

1. im Pharmazeutischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.



Separatdruck aus Pharmaceutica Acta Helvetiae

Bd. 41

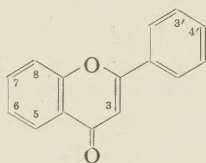
Heft 7 / S. 431-445

Jahr 1966

Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Arnica montana* L.

1. Einleitung

Die papierchromatographische Charakterisierung der Tinctura Arnicae Ph. Helv. V ergibt je nach Laufmittel drei bis fünf Flecke, die sich mit AlCl_3 oder ZrOCl_2 ¹ gelb färben. Durch Anreicherung gelang es uns, Quercetin, 3,5,7,3',4'-Pentahydroxy-flavon, und Isorhamnetin, 3,5,7,4'-Tetrahydroxy-3'-methoxy-flavon, dünnschicht- und papierchromatographisch nachzuweisen. Außerdem isolierten wir an Polyamid-, Cellulosepulver-, Kieselgel- und Sephadexsäulen folgende Stoffe: G1, G2, G3, N3 und Mp 115°. G3 ist identisch mit Kaempferol, 3,5,7,4'-Tetrahydroxy-flavon. Aus G1 gewannen wir nach Hydrolyse Quercetin und Glucose.



Flavon

Bei weiterer Aufarbeitung konnten wir das unhydrolysierte G1 auftrennen in K1, Q1 und Q2. Im Folgenden berichten wir über diese Stoffe.

2. K1

K1 zeigt in seiner Löslichkeit und in seinem Verhalten in Chromatogrammen glykosidischen Charakter. Mit einer Spitzenfraktion (4 mg) erreichten wir den Schmelzpunkt von 194–196°. Im UV-Spektrum zeigt es Absorptionen bei 352 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 356) und 267 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 413 in 95-proz. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Diese Banden weisen auf eine Flavon-Struktur.

¹ Hörhammer L. und Hänsel R., Arch. Pharm. 284, 276 (1951).

Für Flavon (Mol.-Gew. 222,23) werden folgende Absorptionen angegeben: 304 nm ($\log \varepsilon = 4,39$), 270 nm ($\log \varepsilon = 4,23$ in C_2H_5OH)² oder 297 ($\log \varepsilon = 4,20$) und 270 nm ($\log \varepsilon = 4,23$ in C_2H_5OH)³. Die langwellige Bande wird durch die Zinnamoyl-, die kurzwellige durch die Benzoyl-Gruppierung des Moleküls beeinflusst. Hydroxy-Gruppen verstärken und vertiefen die Farbe je nach ihrer Lage. Hydroxyflavone absorbieren im Bereich von 350–320 nm und 270–240 nm. Flavonole (C 3-Hydroxyflavone) haben die längerwellige Bande bei 380–340 nm³.

4 mg in 1 ml H_2O gelöst zeigen keine meßbare Drehung (1 dm-Küvette). Im Papierchromatogramm ist K 1 im UV-Licht als dunkler Fleck zu sehen, der nach Behandlung mit $AlCl_3$ gelb wird und keine gelbgrüne Fluoreszenz zeigt. Nach *Linskens*⁴ gilt das als Merkmal für Flavonol-3-glykoside.

K 1 gewannen wir aus dem G 1. Aus G 1 konnten wir nach Hydrolyse im Aglykonteil Quercetin finden. Die Absorptionsbanden im UV des K 1 aber passen eher zu einem Kaempferol- als zu einem Quercetin-Derivat (Kaempferol 366 nm und 266 nm in C_2H_5OH ; Quercetin 374 nm und 256 nm in C_2H_5OH). Durch Glykosidierung wird der ursprüngliche Beitrag der Hydroxy-Gruppe zur Farbvertiefung herabgesetzt. Während diese Verminderung der Farbtiefe bei einer C 7-Glykosidierung unwesentlich ist, nimmt sie bei C 3, C 5- und C 4'-Glykosidierung einen beachtlichen Betrag an.

Die kurzwellige Bande (Bande II, 267 nm) des K 1 ist gegenüber der entsprechenden des Kaempferols wenig verändert. Anders die langwellige Bande (Bande I, 352 nm), was auf eine Glykosidierung im Zinnamoyl-Teil des Moleküls hindeutet. Wir stellten eine Hypsochromie von 14 nm und eine Intensitätsabnahme von 37 % (Bande II = 100 %) gegenüber Kaempferol fest. Nach *Jurd*³ beträgt diese Hypsochromie bei einer 4'-Glykosidierung eines Flavonols 2 bis 6 nm der Bande I und 1 bis 2 nm der Bande II; bei einer 3-Glykosidierung hingegen 10 bis 20 nm bei der ersten Bande, während die zweite keine Veränderung zeigt. Das UV-Spektrum des K 1 kann somit einem Kaempferol-3-glykosid zugehören.

In Tab. 1 sehen wir viele Übereinstimmungen der UV-Spektren von Kaempferol* mit denjenigen von K 1. Die Differenzen weisen ebenfalls auf eine 3-Glykosidierung hin. Das Natriumacetat-Spektrum, die Bathochromie der Bande II, schließt eine Verätherung oder Glykosidierung am C-7 aus³. C 7-Glykoside erkennt man zudem an der schweren Hydrolysierbarkeit⁵. Das trifft für K 1 nicht zu. Die Beständigkeit der Banden in Gegenwart von Natriumäthylat schließt eine freie 3-4'(OH)₂-Gruppierung aus. Das Ausmaß der Farbvertiefung erfordert aber ein freies Hydroxyl entweder am C 3 oder am C 4'⁶. Im Aluminiumchlorid-Spektrum erkennen wir Extinktionen, die charakteristisch für Aluminium-Flavon-Komplexe sind ($C=O \rightarrow Al_{1/3}-O-C-5$ -chelate); den Hauptabsorptionen (345 nm und 274 nm) gehen kleinere (396 nm und 302 nm)

* Kaempferol puriss. FLUKA AG, Chemische Fabrik, Buchs SG.

² *Scott A. I.*, Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products, Pergamon Press, London, 1964, S. 145.

³ *Jurd L.*, in *Geissmann T. A.*, The chemistry of flavonoid compounds, Pergamon Press, London, 1962, S. 107.

⁴ *Linskens H. F.*, Papierchromatographie in der Botanik, Springer, Berlin, 1955, S. 307.

⁵ *Semrau R.*, Über die Flavone in der Familie der Labiata, Diss. Universität München, 1958, S. 9.

⁶ *Jurd L. und Horowitz R. M.*, J. org. Chem. 22, 1618 (1957).

Tabelle 1
UV-Absorptionsbanden von K1 und Kaempferol

	C ₃ H ₅ OH 95 %	+ C ₃ H ₅ ONa	+ CH ₃ COONa	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ + CH ₃ COONa
K1					
$\lambda_{\max}$ [nm]	352 ~ 300*	408 330 276	366 272	396 345 302 274	~ 392* 344 ~ 302* 274
$\lambda_{\min}$ [nm]	281 238	351 296 252	328 246	370 314 290 248	316 250
Kaempferol					
$\lambda_{\max}$ [nm]	366 ~ 320*	334 252	372 304 269	424 346 ~ 304* 268	420 ~ 348* ~ 302* 269
$\lambda_{\min}$ [nm]	280 238	280	330 286 241	370 316 240	314 240

Tabelle 4
UV-Absorptionsbanden von Q1, Q2 und Quercetin

	C ₃ H ₅ OH 95 %	+ C ₃ H ₅ ONa	+ CH ₃ COONa	+ AlCl ₃	+ AlCl ₃ + CH ₃ COONa
Q1					
$\lambda_{\max}$ [nm]	360 ~ 300*	414 332* 272	378 ~ 324* 270	404 364 ~ 304* 270	427 274
$\lambda_{\min}$ [nm]	287 238	302 246	303 246	320 245	341 248
Q2					
$\lambda_{\max}$ [nm]	367 259	414 ~ 338* 275	373 ~ 320* 270	424 ~ 340* ~ 304* 274	423 274
$\lambda_{\min}$ [nm]	284 237	308 252	304 246	320 248	~ 340
Quercetin					
$\lambda_{\max}$ [nm]	374 256	325 ~ 240*	380 ~ 268* 256	433 ~ 353* ~ 304* 268	445 270
$\lambda_{\min}$ [nm]	286 237	273	290 242	320 248	348 248

* Schulter

voraus⁷. Es steht also kein freies Hydroxyl in Stellung 3 für die Komplexbildung zur Verfügung. Das Fehlen einer Bathochromie nach Zusatz von Natriumacetat zur Aluminium-Flavon-Verbindung schließt eine *o*-Dihydroxy-Gruppierung aus⁷.

Nach Kirmayer⁸ geben *o*-Dihydroxy-flavone mit Bleiacetat unter der Analysen-quarzlampe orange Färbung mit Fluoreszenz. Wir erhielten Gelbfärbung.

Im ZrOCl_2 -Citronensäure-Test nach Hörhammer⁹ zeigt K 1 die für Flavonol-3-glykoside typischen Färbungen.

Zur weiteren Bestätigung der 3-Glykosidierung methylierten wir K 1 (1 mg), um es anschließend zu hydrolysieren.

Tabelle 2

UV-Absorptionsbanden von K1-Derivaten

	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (absol.)	+ $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$	+ AlCl_3
K 1 methyliert			
λ_{max} [nm]	336 $\sim 300^*$ 254	keine Veränderung	keine Veränderung
K 1 methyliert + hydrolysiert			
λ_{max} [nm]	352 256	398 260	418 334 266

* Schulter

Die Reaktion des Hydrolysates mit Aluminiumchlorid zeigt das Vorliegen einer freien 3- oder 5-Hydroxyl-Gruppe (Tab. 2). Das Ausmaß der Verschiebung der vorderen Bande (+ 66 nm) weist auf ein freies 3-Hydroxyl³ hin. Das Spektrum nach Zusatz von Natriumäthylat schließt eine 3,4'-(OH)₂-Gruppierung aus und deutet mit der großen Bathochromie der ersten Bande (46 nm) und der kleinen der zweiten (4 nm) auf ein freies 3-Hydroxyl¹⁰.

Diese Farbreaktionen und Spektren weisen auf ein Kaempferol-3-glykosid. Nach saurer Hydrolyse von 2 mg erhielten wir ein Aglykon, das mit Kaempferol im UV-Spektrum (λ_{max} 366 nm, 266 nm) und in den Rf-Werten übereinstimmt. Im Zuckerteil finden wir bei der papier- und dünn-schichtchromatographischen Untersuchung Glucose. Aus 2 mg K 1 erhielten wir etwa 1,4 mg Aglykonteil (im Monoglucosid ist Kaempferol zu 64 % enthalten). In den dünn-schichtchromatographischen Systemen Polyamid/Wasser-Äthanol-Methyläthylketon-Äthylacetat (10:3:3:1) und Chloroform-Methanol-Methyläthylketon-Äthylacetat (25:10:5:1), fast wassergesättigt¹¹, die gut unterscheiden zwischen Monoglykosiden, Diglykosiden und Triglykosiden von Flavonen, läuft K 1 als Monoglykosid. Wir betrachten deshalb K 1 als ein Kaempferol-3-monoglucosid.

⁷ Jurd L. und Geissmann T., J. org. Chem. 21, 1395 (1956).

⁸ Kirmayer W. J., Über die Flavone der Kompositen, Diss. Universität München, 1959, S. 27.

⁹ Hörhammer L., German H. J. und Endres L., Arch. Pharm. 292, 120 (1959).

¹⁰ Mansfield G. H., Swain T. und Nordström C. G., Nature [London] 172, 23 (1953).

¹¹ Egger K., Planta Med. 12, 265 (1964). [Wir ersetzten das Acetylacetone mit Äthylacetat].

Kürzlich hat *Friedrich*¹² ein Kaempferolglucosid aus den Blüten von *Arnica montana* isoliert (Smp. 171–173°). Er identifizierte es als Astragalin. *Loth*¹³ beschreibt Astragalin, ein Kaempferol-3-monoglucosid (Smp. mit 1 H₂O 172–176°, Smp. wasserfrei 218°–220°) mit den in Tab. 3 aufgeführten folgenden Spektren (die Werte sind einer graphischen Darstellung entnommen).

Tabelle 3

UV-Absorptionsbanden von Astragalin

	CH ₃ OH	+ AlCl ₃
$\lambda_{\max}$ [nm]	350 ~300* 266	398 348 304 276
$\lambda_{\min}$ [nm]	282 242	375 314 290 249

* Schulter

Die Extinktionen ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) in Methanol sind 405 (350 nm), 469 (266 nm). Die Bilder der Spektren decken sich mit denjenigen, die K 1 geben. K 1 dürfte mit Astragalin identisch sein.

Bei der Aufarbeitung des rohen K 1 konnten wir eine Fraktion abtrennen, die zwar das gleiche UV-Spektrum wie K 1 zeigt, aber in einer Sephadex-Säule schneller läuft (Smp. 208–210°). Die Extinktion ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) ist geringer als diejenige des K 1, nämlich 272,5 (352 nm) und 322,5 (266 nm, in 95-proz. C₂H₅OH). In dem oben erwähnten Polyamid-Dünnschichtchromatogramm läuft sie als Monoglykosid. Wir haben diese Fraktion noch nicht weiter untersucht.

3. Q1, Q2

Der Ähnlichkeit wegen, die beide Stoffe im UV-Spektrum zeigen, behandelten wir Q 1 und Q 2 zusammen. Sie zeigen durch ihre Wasserlöslichkeit und Polarität in Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatogrammen glykosidischen Charakter. Aus den bei K 1 eingangs wiedergegebenen Überlegungen können sie Quercetin-Derivate sein. Wir erreichten mit einer Spur Q 1 den Schmelzpunkt 226–230° (Zers.). Das UV-Spektrum des Q 1 zeigt folgende Absorptionen: 360 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 402) und 257 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 495, in 95-proz. C₂H₅OH). Q 2 schmilzt beim Aufheizen bis 300° nicht (~ 240° sintern). Die Spitzenfraktion Q 2 besaß ein UV-Spektrum von 367 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 236) und 253 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 322 nm, in 95-proz. C₂H₅OH). Im Vergleich zu Quercetin* (Tab. 4) zeigt die Zinnamoyl-Bande von Q 1 und Q 2 Hypsochromie und relativ zur Benzoyl-Bande Intensitätsabnahme (Benzoyl-Bande = 100 %), Intensitätsabnahme bei Q 1 = 21 %, bei Q 2 = 29 %. Der kleine Betrag an Hypsochromie bei Q 2 (7 nm) deutet auf eine 4'-, der größere von Q 1 (14 nm) auf eine 3-Substituierung. Eine Glykosidie-

* Quercetin pract., FLUKA AG, Chemische Fabrik, Buchs, SG.

¹² *Friedrich H.*, Naturwiss. 49, 541 (1962).

¹³ *Loth H.* und *Kluge C.*, Arch Pharm. 297, 165 (1964).

rung am C3' macht sich durch eine minimale Hypsochromie bemerkbar³. (Quercetin-3'-glucosid absorbiert bei 370 nm, 325 nm und 253 nm¹⁴.)

Große Ähnlichkeit zwischen Q1 und Q2 sehen wir in den Natriumäthylat- und Natriumacetat-Spektren (Tab. 4). Dank diesen können wir eine 7-Glykosidierung³ und eine freie 3-4'-(OH)₂-Gruppierung⁶ ausschließen. Andererseits ist, gemessen an der starken Farbvertiefung, entweder eine freie 3- oder 4'-Hydroxyl-Gruppe erforderlich. Ein weiteres Argument gegen ein mögliches C7-Derivat ist die leichte Hydrolysierbarkeit⁵. Q1 spaltete sich schon durch halbtägiges Stehenlassen in Äthylacetat, das mit schwefliger Säure gesättigt war, in Aglykon und Zucker.

Das Spektrum des Q1-Aluminiumkomplexes zeigt ein für Flavone typisches Bild (siehe K1). Nach Zusatz von Natriumacetat verändert es sich durch Absorption längerer Wellenlängen, was von freien *o*-Dihydroxylen herrührt⁷. Der Q2-Aluminiumkomplex hingegen ist flavonartig und zeigt im Spektrum keine Veränderung nach Zugabe von Natriumacetat.

Diese Spektren bestärkten unsere Meinung, daß Q1 ein 3- und Q2 ein 4'-Glykosid sein dürfte. Diese Vermutung stützt sich auf die Auslegung der Spektren. Bezüglich des Q2 widerspricht sie der Beobachtung, daß normalerweise Flavonole mit freiem 3-Hydroxyl mit AlCl₃ oder ZrOCl₂ im UV-Licht eine leuchtend gelbe Farbe geben⁴. Wir erhalten bei Q2 nur eine braungelbe Färbung, bei Q1 hingegen wie erwartet ein schwaches Gelb. Außerdem verhalten sich Q1 und Q2 im ZrOCl₂-Citronensäure-Test nach Hörhammer⁹ wie Flavonol-3-glykoside. Nach Besprühung mit Bleiacetat geben beide auf dem Filtrierpapier eine Orangefärbung, die nach Kirmayer⁸ typisch für freie *o*-Dihydroxy-Gruppierungen ist. Eine freie *o*-Dihydroxy-Gruppierung am Quercetin-Molekül schließt eine 4'-Glykosidierung aus. Diese erprobten Farbreaktionen sind gewichtige Argumente gegen unsere Interpretation vor allem der Aluminiumchlorid- und Aluminiumchlorid-Natriumacetat-Spektren. Diesen Gegenbeweisen können leicht weitere hinzugefügt werden:

Nach Jurd¹⁴ werden *o*-Dihydroxy-flavonoide durch eine Farbvertiefung nach Zusatz von Borsäure und Natriumacetat charakterisiert (Tab. 5). Q1 wie Q2 geben

Tabelle 5
UV-Absorptionsbanden von Q1 und Q2

	C ₂ H ₅ OH 95 %	+ B(OH) ₃ + CH ₃ COONa
Q1		
λ _{max} [nm]	360 ~300* 257	381 262
λ _{min} [nm]	287 238	~300 240
Q2		
λ _{max} [nm]	367 259	382 261
λ _{min} [nm]	284 237	~300 242

* Schulter

¹⁴ Jurd L., Arch. Biochem. Biophys. 63, 376 (1956).

diese Farbvertiefung. Beide zeigen nach Zusatz von Reagenzien im UV-Spektrophotometer das gleiche Bild. Nach Methylierung und anschließender Hydrolyse geben Q 1 und Q 2 Produkte, deren Spektren einander ebenfalls entsprechen (Tab. 6).

Tabelle 6
UV-Absorptionsbanden von Q 1-, Q 2- und Quercitrin-Derivaten

	methyliert in C ₂ H ₅ OH absol.			methyliert + hydrolysiert								
				in C ₂ H ₅ OH absol.		— AlCl ₃			+ C ₂ H ₅ ONa			
Q 1												
λ _{max} [nm]	348	264*	250	352	251	418	332	259	400	348	263	
Q 2												
λ _{max} [nm]	350	264*	248	352	250	~420	~333	~260	~404	~348	~262	
Quercitrin												
λ _{max} [nm]	348	264*	250	352	251	418	333	259	400	348	263	

* Schulter

Die Übereinstimmung in den Spektren sowohl der Methyl-Derivate von Q 1 und Q 2 und Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid)* als auch deren Hydrolyseprodukte ist wohl das Ergebnis einer Konformität in der Struktur. Man kann sich die Spektren mit einer C3-Glykosidierung erklären. Freie Hydroxyle nur an den C4' der hydrolysierten Methyl-Derivaten würden die Aluminiumchlorid-Reaktion nicht geben. Ebenso wenig würde auf Zusatz von Natriumäthylat freies Hydroxyl nur an C5 die große Verschiebung der ersten Bande bewirken. Eine Disubstituierung von Q 1 und Q 2 ist durch die eingangs erwähnten Spektren auszuschließen. So verbleibt von den Möglichkeiten bei beiden nur noch eine C3-Glykosidierung.

Mit Magnesium-Salzsäure lassen sich Flavone zu den entsprechenden Flavylum-Salzen reduzieren (Willstättersche Reduktion auf Flavonoide¹⁵). Müller¹⁶ erhielt bei der Reduktion von Spiraeosid, einem Quercetin-4'-monoglucosid, ein Produkt, das eine Absorption bei 505 nm (Methanol-Salzsäure) zeigt. Die entsprechende Bande von Quercetin und von Quercetin-3-glykosiden liegt bei 522–525 nm (Methanol-Salzsäure). Nach Müller färben sich die Lösungen dieser roten Flavylum-Salze beim Alkalisieren blau, sofern sie ein freies Hydroxyl in Stellung 4' haben. Eine freie o-Dihydroxy-Gruppierung verrät sich ebenfalls durch Blaufärbung nach Zusatz von FeCl₃¹⁶.

* Quercitrin pract., FLUKA AG, Chemische Fabrik, Buchs, SG.
¹⁵ Willstätter R. und Mallison H., S. B. preuss. Akad. Wiss. physik.-math. Kl. 1914, 769; zit. nach Müller K. H., Zur Mikroanalytik der Polyoxyflavone, Diss. Universität München, 1953, S. 10.
¹⁶ Müller K. H., Zur Mikroanalytik der Polyoxyflavone, Diss. Universität München, 1953, S. 15, 16, 19, 57.

Bei der Reduktion von Q1, Q2 und Quercitrin erhalten wir einen roten Farbstoff, der die typische Absorption bei 522 nm (Wasser-Salzsäure) zeigt. Auf Zusatz von Natriumbicarbonat und Ammoniak entsteht eine Blaufärbung. Auch mit Ferrichlorid färbt es sich blau. Diese Ergebnisse sprechen sehr dafür, daß sowohl Q1 als auch Q2 ein freies Hydroxyl, bzw. freie 3'- und 4'-Hydroxyle trägt. Wir reduzierten unter Kühlung. Eine Hydrolyse beobachtete Müller unter diesen Bedingungen erst nach 4tägigem Stehenlassen. Die Reduktionsprodukte wurden für die Farbreaktionen (Alkali-, Ferrichloridzugabe) mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt. An der roten Farbe konnte die Verteilung zwischen Isoamylalkohol und Wasser beobachtet werden. Das Reduktionsprodukt von Q2 zeigt eine schlechtere Löslichkeit in Isoamylalkohol als dasjenige von Q1 und Quercitrin. Es lagert sich an die Grenzfläche Isoamylalkohol, Wasser; das besagt, daß Q2 durch den Einfluß von Magnesium-Salzsäure nicht hydrolysiert wurde.

Beide, Q1 wie Q2, gaben nach saurer Hydrolyse als Aglykonteil Quercetin, das wir mittels UV-Spektren (372–374 nm und 254–256 nm) und durch Vergleichen mit Testsubstanzen in Papier- und Dünnschichtchromatogrammen identifizieren konnten. Als Zuckerteil fanden wir bei Q1 und Q2 Glucose. Das Chromatogramm von Q2-Zucker zeigt noch einen weiteren Fleck, der durch seine rasche Anfärbbarkeit (schneller als seine Vergleichszucker) mit Phtalanilid auffällt. Je nach Acidität des Entwicklungsgemisches ändert sich der Laufwert im Vergleich zu den mitaufgetragenen Zuckern, die unter sich eine mehr oder weniger beständige Reihenfolge aufweisen. In saurem Entwicklungsgemisch nimmt die relative Polarität der gesuchten Substanzen ab. Uronsäuren zeigen ebenfalls eine schnelle Anfärbbarkeit mit Phtalanilid (Onsäuren, wie zum Beispiel Glucuronsäure, nicht). Wir verglichen mit Glucuron- und Galacturonsäure*. Der zweite Fleck in den Q2-Zucker-Chromatogrammen zeigt Übereinstimmung mit Galacturonsäure. Q1 ist als ein Quercetin-glucosid zu betrachten und Q2 scheint ein Quercetinglucogalacturonid zu sein. Der nichtmonoglykosidische Charakter des Q2 macht sich in der gegenüber Quercitrin schlechteren Isoamylalkohollöslichkeit des Magnesium-Salzsäure-Reduktionsproduktes bemerkbar¹⁶.

In den dünn-schichtchromatographischen Systemen Polyamid/Wasser-Äthanol-Methyläthylketon-Äthylacetat (10:3:3:1) und Chloroform-Methanol-Methyläthylketon-Äthylacetat (25:10:5:1), fast wassergesättigt¹¹, die gut unterscheiden zwischen Mono-, Di- und Triglycosiden von Flavonen, läuft Q1 als Monoglykosid. Q2 läuft hingegen in diesen Systemen fast nicht. Das entspricht der Beobachtung, die Ribereau-Gayon¹⁷ bei Glucuroniden machte.

Q2 verändert sich bei der Aufarbeitung in seiner Löslichkeit. War es am Anfang gut alkohollöslich, so nimmt diese Löslichkeit mit zunehmender Reinheit ab, die Wasserlöslichkeit zu. Ähnlich verhält es sich an Polyamidsäulen. Zuerst zeigt es die gleiche Laufgeschwindigkeit wie die anderen Glykoside, erscheint mit ihnen zusammen im Eluat; nach der Anreicherung bleibt es aber an der Säule hängen und kann nur unter Zusatz von Alkalien zum Elutionsmittel innert nützlicher Frist desorbiert werden.

* D-(+)-Glucuronsäure purum, D-Galacturonsäure puriss. FLUKA AG, Chemische Fabrik, Buchs, SG.

¹⁷ Ribereau-Gayon P., C. R. Acad. Sci. 258, 1335 (1964); zit. nach Egger K., Planta Med. 12, 265 (1964).

Die Spektren und Farbreaktionen deuten auf eine C3-Glykosidierung des Q1. Für eine C3-Glykosidierung des Q2 sprechen die Farbreaktionen und eine Mehrzahl der Spektren. Die restlichen sind für eine C4'-Glykosidierung, darunter als gewichtigstes das Nichtauftreten einer bathochromen Verschiebung der Absorption nach Zusatz von Natriumacetat zum Q2-Aluminium-Komplex. *Semrau*¹⁸ beobachtete, daß Flavonglucuronide mit Natriumacetat nicht die erwarteten Spektren gaben. Das wird beim Galacturonid Q2 wohl auch der Fall sein. Wir kommen somit zu einer Einheitlichkeit der Untersuchungsergebnisse.

Q1 ist ein Quercetin-3-monoglucosid. Wir nehmen an, daß Q2 ein Quercetin-3-glucogalacturonid ist.

Friedrich isolierte kürzlich aus Arnica-Blüten Isoquercitrin, ein Quercetin-3-monoglucosid (Smp. 225–227°)¹². In der Literatur finden wir folgendes Spektrum für Isoquercitrin: $\lambda_{\max}$ 360 nm, Schulter $\sim$ 295 nm, 258 nm, $\lambda_{\min}$ 258 nm, 238 nm (die Werte sind einer graphischen Darstellung entnommen)¹⁹. Es stimmt in Form und Werten mit demjenigen des Q1 überein. Q1 scheint mit dem Isoquercitrin identisch zu sein.

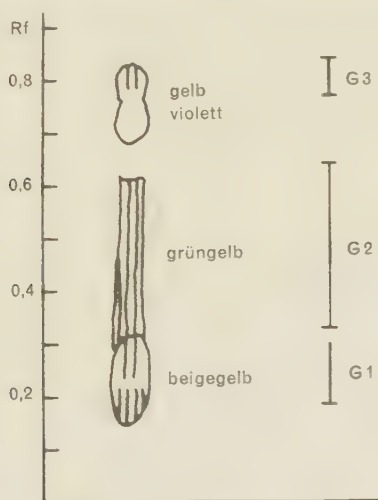
4. Experimenteller Teil

4.1 Isolierung

In unserer Orientierung über die Möglichkeiten der Aufarbeitung stellten wir zuerst mit *Tinctura Arnicae Ph. Helv. V* ein Leitschichtchromatogramm her (Abb. 1).

Abbildung 1

Dünnschichtchromatogramm der *Tinctura Arnicae Ph. Helv. V*



Dünnschicht: Kieselgel G nach *Stahl* (MERCK); Laufmittel: Äthylacetat gesättigt mit schwefliger Säure (5%); Sprühreagens: ZrOCl_2 2% in Methanol; UV-Licht

¹⁸ *Semrau R.*, Über die Flavone in der Familie der Labiata, Diss. Universität München, 1958, S. 17.

¹⁹ *Howard W. L., Gage T. G. und Wender S. H.*, Arch. Biochem. 25, 74 (1950).

Nachher gingen wir direkt von Flos Arnicae Ph. Helv. V aus. Die Droge (1 kg) extrahierten wir vorerst erschöpfend durch Perkolation mit Benzol. Durch Chromatographie dieses Auszuges an Polyamid, Rechromatographie an Cellulosepulver- und Polyamidsäulen und Sublimation im Vakuum (180 · 0,02 Torr) gewannen wir kristalline Nadelchen (35 mg), die im Leerdünnschichtchromatogramm nach Besprühung mit $ZrOCl_2$ im UV-Licht einen schwarzen Fleck auf Höhe der G 3-Zone gaben. Wir bezeichneten diese Kristalle mit N 3.

Die mit Benzol extrahierten Arnicablüten befreiten wir vom Lösungsmittel. Anschließend folgte eine fraktionierte Mazeration unter Erwärmen auf dem Wasserbade mit Methanol, bis der letzte Auszug nur noch einen schwachen Gelbtön aufwies. Zum Schutz vor Oxydation hatten wir Kaliummetabisulfit zugesetzt (0,07 %). Mit Bleiacetat fällten wir die den G-Zonen entsprechenden Anteile (Abb. 1) des Methanolextrakts und setzten sie in Methanol mit H_2S frei. Nach Abdampfen des Methanols nahmen wir sie mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (3:1:6) auf und trennten den Äthylacetat-Teil von der Wasserphase ab.

4.1.1 Äthylacetat-Teil

Wir chromatographierten den Äthylacetat-Teil an Polyamid und gewannen einen gelben Rückstand, der durch wiederholte Chromatographie an Polyamid-, Kieselgel- und Cellulosesäulen und durch Sublimation im Vakuum (170 · 0,02 Torr) zu einem einheitlichen Stoff führte. Er ist mit der G 3-Zone gleich. Wir nennen ihn G 3.

Anreicherungen, die zum G 3 führten, zeigten in verschiedenen chromatographischen Systemen bis sieben Flecke. Einer davon ist identisch mit dem G 3. Ein zweiter stimmt in Laufwert und Farbe mit Quercetin, ein dritter mit Isorhamnetin* überein. Keiner dieser Flecke zeigt Übereinstimmung mit Kaempferid*, 3,5,7-Trihydroxy-4'-methoxy-flavon, und Rhamnetin**, 3,5,3',4'-Tetrahydroxy-7-methoxy-flavon, die wir auf Grund von Laufwerten und UV-Spektren der Roh-Anreicherungen vermuteten.

Bei der Anreicherung von G 3 gelang es auch, etwas vom Farbträger zu gewinnen, der der G 2-Zone entspricht. Wir nennen ihn G 2.

Zur Polyamidchromatographie des Äthylacetat-Teiles dampften wir das Lösungsmittel ab und nahmen den Rückstand mit Benzol auf. Aus dem Teil, der sich aus Benzol an Polyamid nicht adsorbieren läßt, erhielten wir weiße Kristallnadeln. Wir benennen sie nach ihrem Schmelzpunkt Mp 155°.

4.1.2 Wasser-Teil

Den Wasser-Teil ließen wir durch Polyamid fließen, das die den G-Zonen entsprechenden Substanzen adsorbierte. Der Wasser-Teil ist vor allem reich an G 1 und G 2. Mit dem System Cellulosepulver/Eisessig-Chloroform-Wasser (33:63:4)²¹ konnten wir G 1 in sieben Zonen auftrennen, in im UV-Licht vier graue und drei violettblaue. Drei der grauen Zonen enthalten Substanzen, die mit dem G 1 Rf-gleich sind. Eine der violettblauen Zonen entspricht dem G 2. Infolge der unscharfen Auftrennung der G-Zonen konnten wir nur wenige Milligramme oder sogar nur Spuren isolieren.

4.2 Chromatographie

4.2.1 Papierchromatographie

Wir benutzten sie zur Chromatographie der Tinctura Arnicae Ph. Helv. V, zur Untersuchung einzelner Fraktionen, für den Vergleich mit Testsubstanzen und zur Auffindung geeigneter Lösungsmittel. Als Lösungsmittel verwendeten wir reine und frisch destillierte. Für die Chromatographie der Tinctura Arnicae und für Fraktionen und Substanzen flavonoider Natur kamen in Frage:

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (Volumenteile)²²

m-Kresol-Eisessig-Wasser (50:2:48)²²

tert. Butanol-Ameisensäure-Wasser (8:1:1)²³

Äthylacetat gesättigt mit schwefliger Säure (5 %)²⁴

* Wir danken Herrn Prof. Dr. L. Hörhammer, München, für seine Freundlichkeit, uns Isorhamnetin und Kaempferid zur Verfügung gestellt zu haben.

**Rhamnetin pract., FLUKA AG, Chemische Fabrik, Buchs, SG.

²⁰ Vuataz L., Brandenberger H. und Egli R. H., J. Chromatogr. [Amsterdam] 2, 177 (1959).

²¹ Egger K., J. Chromatogr. [Amsterdam] 5, 74 (1961).

²² Bate-Smith E. C. und Westall R. G., Biochim. biophys. Acta 4, 427 (1950).

²³ Fluka, Seltene Naturstoffe, 1959/60, S. 72.

²⁴ Merck E., Aluminiumoxid G, Kieselgel G, Kieselgur G für Dünnschichtchromatographie, S. 8.

Die entwickelten Chromatogramme wurden mit methanolischer $ZrOCl_2$ -Lösung besprüht.

Für die Chromatographie der Zucker verwendeten wir folgende Lösungsmittel:

Pyridin-Äthylacetat-Wasser (1:2:2)²⁵, obere Phase als mobile, untere zur Kammer-sättigung
Laufgeschwindigkeit * 30 cm in 5½ h;

Methyläthylketon gesättigt mit ammoniakalischem Wasser (NH_3 1 %)²⁶. Wir verwendeten es für die durchlaufende Chromatographie. Geschwindigkeit des Laufmittels 30 cm in 2 h. Laufgeschwindigkeit der Glucose 1,5 cm in 16 h.

Zur Sichtbarmachung verwendeten wir Phthalanilid²⁷ und Kaliumpermanganat-Lösungen. Als Vergleichssubstanzen kamen folgende Zucker zur Anwendung: Glucose, Mannose, Galactose, Ribonose, Arabinose, Fructose (für den Q2-Zucker Galacturon-, Glucuron-, Gluconsäure). Diese stellen die bei den Flavonglykosiden am häufigsten vorkommenden Zucker dar.

4.2.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel nahmen wir Linienglas und als Trennkammern mit Filterpapier ausgekleidete Sterilisiergläser²⁸. Für das Arbeiten mit Polyamid eignet sich das Linienglas weniger; denn beim Abschaben des überschüssigen Adsorbens, das auf den Rillenrändern haften wird vom Polyamid aus den Rillen mitgerissen. Auch durch Beimischen von 10–20 % Cellulose konnten wir keine Verbesserung erzielen. Wir suspendierten Polyamidpulver für Dünnschichtchromatographie (MERCK) in einer 8fachen Menge Methanol und strichen es nach kräftigem Schütteln in einem Schliff-Erlenmeyerkolben mit dem Bestreichungsgerät TI 100 der CAMAG** auf Glasplatten aus.

Wir setzten die Dünnschichtchromatographie wie die Papierchromatographie ein.

Für die Chromatographie der Tinctura Arnicae und diejenige von Fraktionen und Substanzen flavonoider Natur kamen die bei der Papierchromatographie erwähnten Lösungsmittel ebenfalls in Betracht, vor allem das Gemisch Äthylacetat-schweflige Säure (50 %). Durch Methanolzusatz kann die G1-Zone (Abb. 1) aufgefächert werden, Äthylacetat-Methanol-schweflige Säure (5 %) (45:5:2,5) (Vol.). Die Laufgeschwindigkeit*** beträgt 10 cm in 15 min, bzw. mit Methanolzusatz 10 cm in 20 min. Nach kurzer Zeit scheiden sich im Gemisch weiße Kriställchen ab, ohne daß in den Bildern die wir auf den Chromatogrammen sehen, Veränderungen festzustellen waren.

Für den Vergleich mit Flavon-Testsubstanzen auf Kieselgel verwendeten wir folgende Laufmittel:

Benzol-Pyridin-Ameisensäure (36:9:5) (Vol.)²⁹. Laufgeschwindigkeit 10 cm in 40 min;

Eisessig-Chloroform-Wasser (33:63:4)²¹. Laufgeschwindigkeit 10 cm in 40 min;

Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5:4:1). Das Kieselgel wurde mit Natriumacetat gepuffert (0,3M wäßrige Natriumacetat-Lösung)³⁰. Dieses Lösungsmittel bildete auf Kieselgel zwei Fronten. Wir beschränkten die Laufstrecke auf 10 cm, um nur eine Frontlinie zu erhalten. Laufgeschwindigkeit 10 cm in 15 min.

Für den Vergleich mit Flavon-Testsubstanzen auf Polyamid kam folgendes Laufmittel zur Anwendung:

Chloroform-Methanol-Methyläthylketon-Äthylacetat (70:10:5:1)¹¹.

Zur Chromatographie der Zucker verwendeten wir:

Äthylacetat-Methyläthylketon-Ameisensäure-Wasser (5:3:3:1), Laufgeschwindigkeit 10 cm in 30 min;

Äthylacetat-Methanol-schweflige Säure 5 % (45:5:2,5), Laufgeschwindigkeit 10 cm in 20 min:

* Als Laufgeschwindigkeit verstehen wir die des Lösungsmittelgemisches auf WHATMAN 1 Papier bei absteigender Chromatographie und 20°.

** CAMAG, Chemie-Erzeugnisse und Adsorptionstechnik AG, Muttenz, BL.

*** Wir verstehen darunter diejenige des Laufmittels auf Kieselgel G nach Stahl (MERCK), das auf Linienglas ausgestrichen ist. Die Rillentiefe des Linienglases beträgt 0,4 mm. Auf Kieselgel DF-5 (CAMAG), das eine große Übereinstimmung mit Kieselgel G in den Chromatogrammen zeigt, ist die Laufgeschwindigkeit durchschnittlich um die Hälfte kleiner.

²⁵ Jermyn M. A. und Isherwood F. A., Biochem. J. 44, 402 (1949).

²⁶ Patridge S. M., Biochem. J. 42, 238 (1948).

²⁷ Patridge S. M., Nature [London] 167, 869 (1951); zit. nach Cramer F., Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1958, S. 117.

²⁸ Gamp A., Studer P. und Meyer K., Experientia 18, 292 (1962).

²⁹ Hörhammer L., Wagner H. und Hein K., J. Chromatogr. [Amsterdam] 13, 253 (1964).

³⁰ Stahl E. und Schorn P. J., Z. physiol. Chem. 325, 263 (1961).

Äthylacetat-Methyläthylketon-Methanol-schweflige Säure (70:20:10:0,5), Laufgeschwindigkeit 10 cm in 20 min;
 Pyridin-Äthylacetat-Wasser (1:2:2)²⁵, obere Phase, Laufgeschwindigkeit 10 cm in 1 h;
 Pyridin-Äthylacetat-Wasser (2:2:1), Laufgeschwindigkeit 10 cm in 1 h;
 Butanol-Aceton-Wasser (40:50:10), Kieselgel borsäurehaltig (das Kieselgel wird mit einer wäßrigen 0,1M H₃BO₃-Lösung angerührt)³¹, Laufgeschwindigkeit 10 cm in 30 min.

Zur Sichtbarmachung verwendeten wir Phtalanilid- und Kaliumpermanganat-Lösung. Bei den Kieselgeldünnschichtchromatogrammen, die mit Ameisensäurehaltigen Lösungsmitteln entwickelt worden waren, konnte Kaliumpermanganat nicht als Sprühreagens verwendet werden; denn trotz stundenlangem Erwärmen im Trockenschrank ließ sich die Ameisensäure nicht völlig entfernen, so daß Kaliumpermanganat von Ameisensäure-Resten sofort zu Braunstein reduziert wurde.

4.2.3 Säulenchromatographie

Es kamen nur adsorptionschromatographische Verfahren zur Anwendung. Als Adsorbentien gebrauchten wir Polyamid*³², Cellulosepulver**, Kieselgel***³³ und Sephadex****.

Zur Chromatographie mit Polyamid lösten wir die Substanzen in Wasser, Wasser-Methanol-Gemischen, in Methanol oder Benzol und trugen sie in dieser Lösung auf die Säule auf. Wir eluierten mit Wasser, Wasser-Methanol-Gemischen mit steigendem Methanol-Gehalt, mit Methanol und Methanol-Ammoniak konz. 25% (95:5) in dieser Reihenfolge der Lösungsmittel. Entgegen Literaturangaben konnten wir Polyamid nicht so weit regenerieren, daß es wieder farblos wurde. Vorgängig der Chromatographie wurde Polyamid, wie die übrigen Adsorbentien, lange und gründlich mit den zur Anwendung gelangenden Lösungsmitteln ausgewaschen. Es gibt dabei einen im UV-Licht blau fluoreszierenden Stoff ab, der bei etwa 206 nm (C₂H₅OH 95%) eine Absorption zeigt. Trotz langem Auswaschen gelang es uns nicht, zu verhindern, daß Ultramid mit Methanol immer wieder mit Ninhydrin Anfärbbares ins Eluat abgibt.

Cellulose adsorbiert aus Äthylacetat die G-Zonen (Abb. 1) besser, als es die gleiche Menge Polyamid tut. Flavonglykoside zeigen dabei eine größere Affinität als ihre Aglykone. Lösungsmittel, die in der Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel schöne Trenneffekte zeigten, gaben in der Säulenchromatographie mit Cellulosepulver ein Bild, das mit dem des Dünnschichtchromatogramms vergleichbar war.

Kieselgel zeigt in Äthylacetat ein größeres Adsorptionsvermögen für die G-Zonen als Polyamid. Wir trugen die Substanzen in Benzol oder Äthylacetat gelöst auf und eluierten in der Reihenfolge: Benzol, Chloroform, Äthylacetat-Methanol. Wir konnten so Aglykone von Begleitstoffen abtrennen, die im Dünnschichtchromatogramm im UV-Licht nach Besprühung mit ZrOCl₂ violett erscheinen. Mit steigendem Methanol-Gehalt des Lösungsmittels nimmt der Anteil an Kieselgel im Eluat zu.

Den gleichen Nachteil zeigt ebenfalls die Filtration durch Sephadex-Schleim. Trotz langem Auswaschen ist im Filtrat immer wieder ein Rückstand zu finden, der vom Sephadex herrührt. Sephadex ist ein Dextran, das, mit Wasser aufgequollen, zur Trennung von Molekülen nach Form und Größe dient. Kleinere Moleküle, die in das Netzwerk des Sephadex-Gel eindringen können, werden länger zurückgehalten als größere, die außerhalb der Gelteile durchfließen. Adsorptionskräfte spielen zusätzlich eine Rolle. Als Lösungsmittel kommen Wasser oder höchstens verdünnte alkoholische Lösungen in Frage.

Zur Aufdeckung der Zonen belichteten wir die Säule mit einer Analysenquarzlampe, wobei trotz der Glaswandung der Säule Farben und Fluoreszenzen zum Vorschein kamen. Die Abtropfgeschwindigkeit richteten wir nach der Säulengröße. Sie betrug ungefähr r^2 ml/min (r = Säulenradius in cm). Mit fortschreitender Chromatographie steigerten wir die Geschwindigkeit langsam. Die Eluatsfraktionen

* Wir danken der BADISCHEN ANILIN- & SODAFABRIK AG, Ludwigshafen am Rhein, für ihr freundliches Entgegenkommen, uns Polyamid K228 BM2 zur Verfügung gestellt zu haben.

** Wir verwendeten Genuine WHATMAN Cellulose Powder, Standard Grade.

*** Wir verwendeten Kieselgel der Firma MERCK, Korngröße 0,2-0,5 mm.

**** Wir verwendeten Sephadex G25 fine, Herst. AB PHARMACIA, Uppsala, Schweden.

³¹ Prey V., Berbalk H. und Kausz H., Mikrochim. Acta 1961, 968.

³² Carelli V., Liquori A.M. und Mele A., Nature [London] 176, 70 (1955);

Grassmann W., Hörmann H., Wagner H. und Hartl A., Makromolekulare Chem. [Basel] 21, 37 (1956);

Hörhammer L. und Wagner H., Pharm. Ztg. 104, 784 (1959).

³³ Bradfield A.E., Penney M. und Wright W.B., J. chem. Soc. [London] 1947, 32; Bradfield A.E. und Penney M., J. chem. Soc. [London] 1948, 2249.

untersuchten wir dünn-schichtchromatographisch und beurteilten sie zum Teil nach ihrem Bild im UV-Spektrophotometer.

4.3 Untersuchung mit dem UV-Spektrophotometer

Wir verwendeten den UV-Spektrophotometer BECKMAN DB. Eine günstige Konzentration für Flavonuntersuchungen sind $2-5 \cdot 10^{-5}M$ Lösungen. Zur Messung der Absorptionsverschiebungen nach Zusatz von Natriumäthylat, Natriumacetat, Aluminiumchlorid, Aluminiumchlorid mit Natriumacetat, Borsäure und Natriumacetat gingen wir folgendermaßen vor: Wir bereiteten eine Äthanol-Lösung, die die zweifache Menge der günstigen Konzentration an Flavon pro ml enthielt, und nahmen zur Messung je 1 ml davon, den wir mit 1 ml Äthanol oder 1 ml äthanolischer Reagens-Lösung versetzten.

Reagens-Lösungen. Natriumäthylat $4 \cdot 10^{-3}M^6$; $AlCl_3$ $10^{-3}M^7$; Borsäure, gesättigte Lösung¹⁴; Natriumacetat, frisch geschmolzen, festes, im Überschuß zugegeben^{6,7,14}. Nach Zusatz von $AlCl_3$ wurde das Gemisch 45 min³⁴, nach Zugabe von Natriumacetat 20 min unter häufigem Schütteln stehen gelassen, bevor die Spektren aufgenommen wurden.

4.4 Schmelzpunkt, Sublimation

Sämtliche Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Wir bestimmten sie auf dem Koflerblock auf einem Objektträger mit eingeschliffener Vertiefung, um eventuelle Sublimation besser feststellen zu können. Flavonaglykone sind sublimierbar und können durch Sublimation nicht nur gereinigt, sondern auch von Homologen getrennt werden. Es scheint eine Beziehung zwischen der Anzahl Hydroxyle und der Sublimationsgeschwindigkeit zu bestehen.

4.5 $ZrOCl_2$ -Citronensäuretest auf Flavonol-3-glykoside nach Hörhammer^{9,35}

Flavonol-3-glykoside bilden mit Zr ein Chelat zwischen dem 5-Hydroxyl und dem Carbonylsauerstoff. Dieser Komplex ist gegenüber Säuren instabil (Abnahme der Gelbfärbung), während die C3-Chelatverbindung, die ein Flavonolaglykon zu bilden vermag, erhalten bleibt. Durch die Salzsäuredämpfe findet eine Spaltung der glykosidischen Bindung statt, wodurch das 3-Hydroxyl zur Komplexbildung mit Zr frei wird (Zunahme der Gelbfärbung).

Tabelle 7

$ZrOCl_2$ -Citronensäuretest mit Quercetin, Quercitrin, K1, Q1 und Q2

	+ $ZrOCl_2$	+ $ZrOCl_2$ + Citronensäure	+ $ZrOCl_2$ + HCl-Dämpfe
Quercetin	gelb	gelb, Intensität erhöht	leuchtend grüngelb
Quercitrin	braungelb	gelblich	grüngelb
K1	gelb	gelblich	leuchtend gelb
Q1	gelb	gelblich	grüngelb
Q2	braun	dunkelgrau	gelbbraun

Die Farben wurden unter der Analysenquarzlampe beobachtet

4.6 Hydrolyse der Glykoside

Wir lösten die Glykoside (1–2 mg) unter Erwärmen in 1 ml 7-proz. H_2SO_4 und hydrolysierten sie 1 h am Rückfluß auf dem Wasserbad. Nach Abkühlen und Absetzenlassen gossen wir die Flüssigkeit ab. Die Aglykone blieben als Rückstand im Kolben und wurden durch Auswaschen mit Wasser, durch Polyamidchromatographie und Sublimation gereinigt. Wir untersuchten sie im UV-Spektrophotometer und verglichen sie mit Testsubstanzen mittels Dünnschicht- und Papierchromatographie. Die abgegossene Lösung neutralisierten wir mit $BaCO_3$, filtrierten ab und wuschen den Niederschlag mit Wasser aus. Nach Einengen, Stehenlassen und wiederholter Filtration prüften wir das Filtrat papier- und dünn-schichtchromatographisch auf Zucker.

³⁴ Christ B. und Müller K. H., Arch. Pharm. 293, 1033 (1960).

³⁵ Müller K. H., Zur Mikroanalytik der Polyhydroxyflavone, Diss. Universität München, 1953, S. 54.

4.7 Methylierung der Glykoside³⁶

1–2 mg Glykoside wurden in 0,5 ml Dimethylsulfat gelöst (Gelbfärbung). Diese Lösung nahmen wir in 5 ml frisch destilliertem Aceton auf und fügten 0,6 g frisch geschmolzenes Kaliumcarbonat hinzu. Wir erwärmten 30 h am Rückfluß auf dem Wasserbad. Dann wurde die acetonige, blau fluoreszierende Lösung abgossen. Die 5-Hydroxy-Gruppe widersteht der Methylierung am längsten³⁷. 5-Methoxyflavone fluoreszieren unter der Analysenquarzlampe blauviolett³⁸. Nach Abdampfen des Acetons zogen wir den Rückstand mit absolutem Alkohol aus. Von dieser Lösung wurde ohne weitere Reinigung das UV-Spektrum der Methyläther aufgenommen.

Die alkoholische Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt, mit 1 ml 7-proz. H₂SO₄ versetzt und eine Stunde auf dem Wasserbad am Rückfluß erwärmt. Nach Entfernen des Alkohols wurde die Lösung einige Zeit stehen gelassen und anschließend durch eine Polyamidsäule filtriert. Es blieb eine im UV-Licht hell fluoreszierende Zone zurück. Das Eluat dieser Zone und den Rückstand, der nach dem Abgießen der Lösung im Kolben blieb, verwendeten wir für die spektrophotometrische Untersuchung der hydrolysierten Methyläther.

4.8 Reduktion mit Mg-HCl¹⁶

Wir lösten die Substanz mit wenig Wasser (Q2) und Methanol (Quercitrin und Q1). Es standen uns für diese Reaktionen weniger als 0,5 mg an Q1 bzw. Q2 zur Verfügung. Zur Lösung gaben wir etwa 0,05 g Magnesiumpulver und fügten portionenweise 0,5 ml konz. Salzsäure hinzu. In der Zwischenzeit hielten wir das Glas verschlossen. Die Reduktion läßt sich an der Rotfärbung verfolgen. Eine Stunde nach der ersten Salzsäure-Zugabe nahmen wir direkt aus dieser Lösung das UV-Spektrum auf, nachdem wir die zur Messung geeignete Konzentration und das passende Volumen mit Wasser eingestellt hatten. Wir schüttelten diese Lösung bis zur Entfärbung der wäßrigen Phase mit wenig Isoamylalkohol aus. Einen Teil davon neutralisierten wir mit wäßriger, gesättigter Natriumacetat-Lösung und fügten einen Tropfen methanolischer Ferrichlorid-Lösung (1 %) zu. Andere Anteile alkalisierten wir mit NaHCO₃ oder mit NH₃. Sowohl nach Zusatz von FeCl₃ wie von NH₃ und NaHCO₃ erhielten wir Blaufärbung. Die Färbung nach der Alkalisierung war schwächer als diejenige mit Eisen und nur kurze Zeit beständig.

Als UV-Lichtquelle verwendeten wir eine Analysenquarzlampe mit Hochdruckbrenner, Marke ROTAX.

Die optische Drehung wurde mit der Natrium-D-Linie bei 22°–24° bestimmt.

Zusammenfassung

Aus Flos Arnicae Ph. Helv. V wurden mehrere Substanzen isoliert, die auch in Tinctura Arnicae Ph. Helv. V vorkommen. Im Vorliegenden werden die Substanzen K1, Q1 und Q2, die ein Kaempferol-3-monoglucosid, ein Quercetin-3-monoglucosid und ein Quercetin-3-glucogalacturonid darstellen, beschrieben.

Résumé

Plusieurs substances ont été isolées de Flos Arnicae Ph. Helv. V qui sont également présentes dans Tinctura Arnicae Ph. Helv. V. Les substances K1, Q1 et Q2, kaempferol-3-monoglucoside, quercétine-3-monoglucoside et quercétine-3-glucogalacturonide respectivement, sont décrites.

³⁶ Geissmann T. A. und Steelink C., J. org. Chem. 22, 946 (1957).

³⁷ Simpson T. H. und Beton J. L., J. chem. Soc. [London] 1954, 4065.

³⁸ Kuhn R. und Löw J., Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 211 (1944).

Summary

From Flos Arnicae Ph. Helv. V different substances, which are also present in Tinctura Arnicae Ph. Helv. V, have been isolated. The substances K 1, Q 1 and Q 2, kaempferol-3-monoglucoside, quercetin-3-monoglucoside and quercetin-3-glucogalacturonide respectively, are described.

Lebenslauf

Als Sohn des Ernst Saner, Apothekers, und der Alice, geborenen Gruber, wurde ich, Alphonse Jean-François Saner, am 5. 2. 1935 in Lausanne geboren. Ich bin Bürger von Büsserach, Kanton Solothurn.

Nach 5 Jahren Primarschule, die ich in Laufen, Kanton Bern, besuchte, trat ich 1947 in das Gymnasium des Kollegiums Karl Borromaeus ein, das ich 1953 mit dem Maturitätszeugnis Typ A verließ.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich das Pharmaziestudium an der Universität Basel. Im Frühjahr 1955 bestand ich die Naturwissenschaftliche Prüfung für Apotheker. Das anschließende anderthalbjährige Praktikum absolvierte ich in der Jura-Apotheke in Basel und beendigte es, durch Militärdienst unterbrochen, im Frühjahr 1957 mit der Pharmazeutischen Assistentenprüfung.

Das Assistentenjahr führte mich in die väterliche Apotheke in Laufen und in die Apotheke Kuoch in Olten. Die folgenden Fachsemester an der Universität Basel schloß ich mit der pharmazeutischen Fachprüfung ab.

Nach Tätigkeit in verschiedenen Apotheken fand ich eine Anstellung als Assistent am Pharmazeutischen Institut der Universität Basel und begann im Januar 1961 unter der Leitung von Prof. Dr. K. Leupin die vorliegende Arbeit.

Folgenden Dozenten, deren Kurse und Vorlesungen ich besuchte, bin ich zu Dank verpflichtet:

Baertschi, Baur, Bucher, Buchner, Dahn, Erlenmeyer, Ernst, Geiger-Huber, Grob, Grün, Huber, Iselin, Kuhn, Labhart, Leupin, Meyer, Portmann, Reichstein, Salmony, Tamm, Tomcsik, Tschudi-Steiner, Wizinger.

